

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年5月6日(06.05.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/040390 A1

(51) 国际分类⁷: C12N 15/86, 15/50, 15/51, A61K 39/00, C12N 7/01

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000845

(22) 国际申请日: 2004年7月21日(21.07.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
03141721.3 2003年7月21日(21.07.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海天甲生物医药有限公司(SHANGHAI TENGGEN BIOMEDICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区哈雷路1011号206室, Shanghai 201203 (CN)。美国天甲生物医药有限公司(TENGGEN BIOMEDICAL CO.) [US/US]; 美国马里兰州罗克威里200单元大森卡路9700号, Rockville, MD 20850 (USA)。北京东方天甲科技发展有限公司(BEIJING ORIENTAL TENGGEN TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市前门东大街7号, Beijing 100006 (CN/CN)。

(72) 发明人:及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 庞小伍(PANG, Xiaowu) [US/US]; 顾心彬(GU, Xinbin) [US/US]; 美国马里兰州罗克威里200单元大森卡路9700号, Rockville, MD 20850 (USA)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

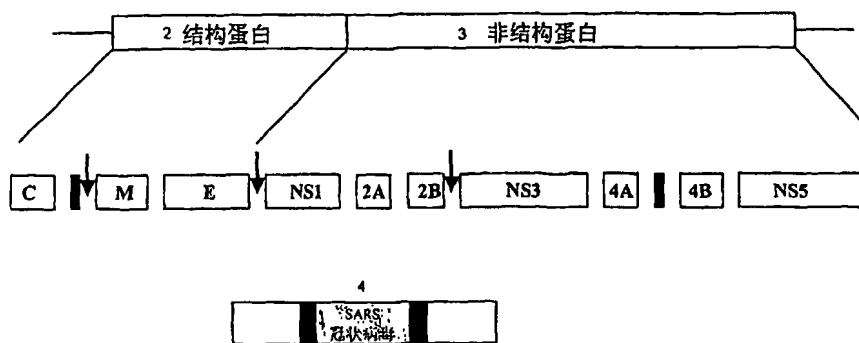
本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A RECOMBINANT VACCINE USING YELLOW FEVER VIRUS AS VECTOR

(54) 发明名称: 重组的以黄热病病毒为载体的疫苗

1 黄热病病毒的RNA基因



- 1 RNA GENE OF A YELLOW FEVER VIRUS
- 2 STRUCTURAL PROTEIN
- 3 NON-STRUCTURAL PROTEIN
- 4 SARS CORONAVIRUS

(57) Abstract: The present invention provides a yellow fever virus vector, into which exogenous polypeptide expression element was inserted, said expression element comprises in the order of 5' to 3': (a) a 5' releasing element; (b) a gene element encoding exogenous polypeptide; and (c) a 3' releasing element, said releasing elements are selected from: a nucleotide sequence encoding hydrolase from foot-and-mouth disease virus, a nucleotide sequence encoding hydrolase from signal peptide, and their combination. The vector can provide antigenic polypeptides of virus and tumor in the host to elicit immunological reaction to the virus and tumor.

[见续页]



(57) 摘要

本发明提供了一种黄热病病毒载体，在其基因组中插入外源多肽表达组件，所述表达组件从 5'至 3'依次具有：(a)5'端释放元件；(b) 编码外源多肽的基因元件；和(c) 3'端释放元件，所述的释放元件选自：编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码信号肽水解酶底物的核苷酸序列，及其组合。该载体可在宿主细胞中提供病毒及肿瘤的抗原性多肽，从而引发针对病毒及肿瘤的免疫反应。

重组的以黄热病病毒为载体的疫苗

技术领域

本发明涉及病毒学和免疫学领域，更具体地涉及表达外源多肽（如抗原）的黄热病病毒载体及含该载体的重组疫苗。

背景技术

黄热(病)病毒(yellow fever vaccine, YFV)呈球形，直径 40-50 nm，由包膜和核壳体构成，核壳体由衣壳蛋白(C)与核酸构成，包膜表面有囊膜糖蛋白(E)刺突，囊膜内尚有内膜蛋白(M)，参与病毒的装配。病毒基因组为单股正链 RNA，全长 11kb，自 5' 至 3' 端依次编码结构蛋白 C、M、E 以及非结构蛋白 NS1-NS5，病毒 RNA 在细胞浆内直接起 mRNA 作用，翻译出结构蛋白和非结构蛋白。

由黄热病病毒感染引起的黄热病(yellow fever, YF)为人畜共患病，目前还不能被彻底根除，但通过在黄热病爆发流行或在进入黄热病流行地区前接种 17D 黄热病病毒疫苗，以及在黄热病流行的地区对儿童进行黄热病病毒疫苗的常规免疫接种，可以有效的降低人群的患病率。

17D 黄热病病毒疫苗(17D yellow fever vaccine)为减毒活疫苗，于 1937 年由 Max Theiler 和 Simth 发明，是世界卫生组织(WHO)认定的标准安全疫苗，亦是目前生产使用的唯一安全有效预防黄热病的疫苗。(Monath TP. Stability of yellow fever vaccine. Dev Biol Stand 1996; 87:219-25)

于 1945 年建立的 17D 黄热病病毒疫苗的病毒种子库有效地解决了疫苗灭活条件不稳定的情况，并使 17D 黄热病病毒疫苗得以普遍安全的使用，自 1945 年，疫苗在全球的使用量超过 4 亿支。免疫接种后，10 天内可引发免疫，有效率可达 95%以上，并且可检测到病毒中和抗体的期限可达 35 年。

17D 黄热病病毒疫苗对成人免疫的血清转化率达 93.8%，对 6 个月大婴儿和 9 个月大婴儿免疫的血清转化率可分别达 98.6%和 98%。(Osei-Kwasi M, Dunyo SK, Koram KA, et al. Antibody response to 17D yellow fever vaccine in Ghanaian infants. Bull World Health Organ 2001; 79(11):1056-9)

由 17D 黄热病病毒疫苗免疫接种而引起的严重副作用及疫苗的病毒突变率均非常罕见，几乎不存在回复野生型的可能性，因此其有效性及安全性已得到了充分验证。

严重急性呼吸综合征(Severe Acute Respiratory Syndromes, SARS)，在中国大陆又称传染性非典型性肺炎(简称非典)，是一种主要通过近距离空气飞沫和密切接触传播的传染性很强的呼吸道传染病，最初于 2002 年 11 月在中国大陆的广东省发现，并迅速波及亚洲、北美洲、欧洲等 33 个国家和地区。SARS 的临床主要表现为肺炎，在家庭和医院有显著的聚集现象。起病急，以发热为首发症状，体温一般高于 38℃，偶有畏寒；可伴有头痛、关节酸痛、肌肉酸痛、乏力、腹泻；可有咳嗽，多为干咳、少痰，偶有血丝痰；可有胸闷，严重者出现呼吸加速，气促，或明显呼吸窘迫。致死率约 3.5%。SARS 不同于一般感冒，一般感冒的病症包括发烧，咳嗽，头痛，可在数日后转好，并且一般

没有肺炎迹象。

2003年4月16日,世界卫生组织正式宣布SARS的病原体是一种新的冠状病毒,并正式命名为SARS冠状病毒(SARS coronavirus)。

5 SARS冠状病毒为ssRNA(+)病毒,复制不经过DNA中间体,使用标准密码子。在电镜下,病毒颗粒呈不规则形,直径约为60-220nm,其表面有梅花形的膜粒,状如皇冠。颗粒中心在负染电镜下呈不定形态,核壳体呈疏松状态。SARS冠状病毒的结构蛋白包括刺突蛋白(S)、小膜蛋白(E)、跨膜蛋白(M)与核衣壳蛋白(N)。S蛋白与病毒的感染性密切相关,介导病毒与宿主细胞的受体结合及病毒包膜与宿主细胞膜的融合,该蛋白是冠状病毒保护性免疫的主要抗原。M蛋白参与包膜形成,在病毒出芽释放过程中起
10 重要作用。N蛋白参与病毒RNA的包装及核衣壳的形成,并协助S蛋白抗体的产生。在一些亚类中,还有第三种糖蛋白,HE红细胞凝集素酯酶。基因组RNA与碱性磷酸蛋白N结合。

SARS疫情的爆发,在世界范围引起了很大的震动。为了有效地控制和预防SARS,人们正在开发各种SARS疫苗,其中主要有五种类型:灭活疫苗、减毒活疫苗、重组亚单位疫苗、DNA疫苗和减毒病毒载体疫苗。其中以减毒病毒载体疫苗最受青睐,被认为是
15 技术含量最高、最有希望成功的SARS疫苗。许多研究所和公司都选择了以减毒腺病毒载体研制SARS疫苗。

然而,现有的以减毒腺病毒载体研制疫苗的技术存在以下缺陷:

- 20 (1)大多数人(55%)体内有腺病毒抗体,接种疫苗时,抗体与腺病毒载体结合,严重影响疫苗效果;
- (2)高滴度时,细胞毒性较大;
- (3)载体有回复野生型的可能性,存在安全隐患。

WO0153467公开了一种重组黄病毒,其中包括可编码外源氨基酸序列的外源核苷酸序列。用重组黄病毒感染宿主细胞,可在宿主细胞中提供外源核酸,并产生由外源核酸编
25 码的抗原性多肽,进而引发对外源多肽的免疫应答。然而,其缺点是(a)使用了可自主复制增殖的黄热病病毒,保留了全部的黄热病病毒基因组序列,没有结构蛋白基因的缺失。(b)插入的外源序列仅为约30个核苷酸的小片段基因序列,不太适合插入长度超过300bp的片段,尤其长度超过1000bp的片段。(c)所用的蛋白酶切割位点的切割效果还不十分令人满意。

30 因此,本领域迫切需要开发更安全更有效的用于预防SARS等病毒性疾病的疫苗。

发明内容

本发明的目的就是提供一种表达SARS冠状病毒抗原的黄热病病毒载体及含该载体的重组SARS疫苗。

35

在本发明的第一方面,提供了一种黄热病病毒载体,在所述的黄热病病毒的基因组中插入外源多肽表达组件,所述的表达组件从5'至3'依次具有以下元件:

(a) 5' 端释放元件, 所述的 5' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合:

(b) 编码外源多肽的基因元件;

- 5 (c) 3' 端释放元件, 所述的 3' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合,

所述的表达组件插入黄热病病毒基因组的编码区, 且不引起黄热病病毒的基因组序列发生移码。

- 10 在另一优选例中, 所述的外源多肽是病毒蛋白或癌相关蛋白。

在另一优选例中, 所述的外源多肽的基因元件是全长的 SARS-冠状病毒的 S1 基因、N 基因、S 基因、S2 基因、M 基因或上述基因的片段或其组合。

在另一优选例中, 所述的表达组件插入黄热病病毒基因组的位点选自下组:

- (i) NS2B 编码区和 NS3 编码区之间;
15 (ii) E 编码区和 NS1 编码区之间;
(iii) C 编码区和 prM 编码区之间。

在另一优选例中, 所述的 5' 端释放元件和 3' 端释放元件都是 SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列。

- 20 在另一优选例中, 所述的 5' 端释放元件是编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列。

在另一优选例中, 所述的黄热病病毒基因组缺失了部分黄热病病毒结构蛋白基因序列, 所述缺失的结构蛋白基因序列选自下组: C 蛋白、prM 蛋白、E 蛋白或其组合。

在本发明的第二方面, 提供了一种药物组合物, 它含有本发明上述的黄热病病毒载体和药学上可接受的载体。

- 25 在本发明的第三方面, 提供了本发明所述的黄热病病毒载体的用途, 它们被用于制备预防或治疗性疫苗。

在本发明的第四方面, 提供了一种制备黄热病病毒的方法, 包括步骤:

(1) 将黄热病病毒基因组引入包装细胞, 其中所述的黄热病病毒基因组中插入了外源多肽表达组件, 所述的表达组件从 5' 至 3' 依次具有以下元件:

- 30 (a) 5' 端释放元件, 所述的 5' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合:

(b) 编码外源多肽的基因元件;

- 35 (c) 3' 端释放元件, 所述的 3' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合,

且所述的基因组缺失了选自下组的结构蛋白基因序列: C 蛋白、prM 蛋白、E 蛋白或

其组合, 并且重组后的基因组保留了自我复制功能;

而所述的包装细胞选自下组:

- (i) 被含所述病毒缺失的结构蛋白基因的质粒转染的细胞,
- (ii) 被含所述病毒缺失的结构蛋白基因的辅助病毒载体转染的细胞, 和
- (iii) 基因组整合有所述病毒缺失的结构蛋白基因的细胞;

(2) 培养步骤(1)的包装细胞;

(3) 从培养物中分离出重组黄热病病毒。

附图说明

10 图 1 为黄热病病毒的 RNA 基因结构示意图。

图 2 为把黄热病病毒 RNA 转化成三段黄热病病毒 cDNA 片段的流程图。

图 3 为制备全长的黄热病病毒 cDNA 克隆的流程图。

图 4 为制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 NS2B 和 NS3 之间的经口蹄疫病毒的基因片段 (2A) 修饰的冠状病毒疫苗的流程图。

15 图 5 为制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS 1 之间的经口蹄疫病毒的基因片段 (2A) 修饰的冠状病毒疫苗的流程图。

图 6 为制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS 1 之间的经口蹄疫病毒的基因片段 (2A) 和信号肽水解酶底物的基因片段修饰的冠状病毒疫苗的流程图。

20 图 7 为制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 C 和 prM 之间的经口蹄疫病毒的基因片段 (2A) 修饰的冠状病毒疫苗的流程图。

图 8 为制备含有 YFV 亚基因组的 SARS 疫苗和 HBV 疫苗的流程图。

具体实施方式

25 本发明人经过深入而广泛的研究, 开发了一种预防病毒性疾病 (如 SARS) 的疫苗, 此疫苗是在黄热病病毒的基因组中插入两侧带有释放元件的病毒抗原多肽的基因元件, 其中释放元件是口蹄疫病毒的基因片段 (2A) 和/或信号肽水解酶底物的基因片段。采用上述结构的表达组件时, 不仅能够使 SARS 病毒、HBV 等抗原多肽的基因元件稳定地存在于黄热病病毒的基因组中, 而且在黄热病病毒感染宿主细胞时能够有效地释放出抗原性多肽, 从而有效地激发免疫应答。在此基础上完成了本发明。

30

术语

如本文所用, “外源多肽的基因元件” 指编码外源多肽的核酸序列。

如本文所用, “外源多肽” 指天然黄热病病毒基因组不编码的多肽, 例如各种抗原、抗原决定簇、细胞因子、生长因子、多肽类激素、酶、受体、抗体和/或癌相关蛋白。

35 特别优选的外源多肽是 SARS 病毒、HBV 病毒、HCV 病毒、HIV 病毒的抗原多肽、癌抗原多肽, 尤其是分子量为 1-200Kda, 较佳地为 10-150Kda, 更佳地 20-100Kda 或更大的抗原多肽。例如, “SARS 抗原性多肽” 指任何能够引起针对 SARS 病毒的免疫应答的多肽,

代表性的例子包括 S 蛋白、N 蛋白等。抗原性多肽可以是全长蛋白或其片段。抗原性多肽可以是天然的，也可以是突变的。

如本文所用，“释放元件”指位于外源多肽的基因元件两侧的核酸序列，当与外源多肽的基因元件一起翻译成蛋白质后，用于释放完整的、不含无关序列的外源多肽。释放元件包括 5' 端释放元件和 3' 端释放元件。优选的 5' 和 3' 端释放元件选自：SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列，及其组合。在抗原性基因元件任一侧的释放元件通常为一个，但也可以是多个。

如本文所用，术语“外源多肽表达组件”指具有以下结构的一段核酸序列：

5' 端释放元件-外源多肽的基因元件-3' 端释放元件

外源多肽表达组件可以不包含启动子、起始密码子和终止密码子。当该外源多肽表达组件插入黄热病病毒基因组后，会与黄热病病毒的核苷酸序列一起表达一个大前体蛋白。然后，在该前体蛋白的后期加工过程中，水解酶会酶切 5' 端和 3' 端释放元件所编码的氨基酸序列后，从而释放出外源多肽（如 SARS 抗原性多肽）。

术语“免疫活性”或“免疫原性”指由天然、重组或合成的肽诱导哺乳动物体内的特异性体液和/或细胞免疫应答的能力。本文所用的术语“抗原性多肽”或“抗原性肽”指可引发哺乳动物免疫应答的氨基酸序列，无论是单独或与辅助分子结合（如 I 或 II 类主要组织相容性抗原分子）。

本文所用的术语“免疫应答”包括细胞性和/或体液性免疫应答，它们足以抑制或防止感染；或防止或抑制由微生物（尤其是病原性微生物）导致的疾病的发作。

如本文所用，术语“对象”或“个体”或“患者”指需要进行诊断或治疗的任何目标，尤其是哺乳动物对象，特别是人，其它对象包括牛、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马等。特别受关注的是那些易受黄病毒（如黄热病病毒）感染的对象，如可以支持黄热病病毒复制的对象。

“生物样品”包括从生物体得到，且可用于诊断或监测分析的各种样品类型。该术语包括血样和其它生物性液体样品、固态组织样品（如活组织检查样品或组织培养物或其衍生的细胞及它的子代）。该术语包括在购置后以任何方法操作的样品，如用试剂处理、溶液化或富集其某些成分。该术语包括临床样品，还包括细胞培养物、细胞上清液、细胞溶解产物、血清、血浆、生物液体和组织样品。

重组的黄热病病毒载体

可从公用数据库（包括，如 GenBank）获得若干 YFV 毒株的核苷酸序列。示范毒株是“YFV 17D”。可在 GenBank 登记号 X03700 获得 YFV 基因组的核苷酸序列以及可编码病毒多蛋白的氨基酸序列。黄热病病毒颗粒的生产是本领域所熟知的。

本发明所述的 YFV 基因组，可以是全基因组，也可以是缺失部分核酸序列的亚基因组。在本发明的一个实施方案中，所述的 YFV 基因组是全基因组。在本发明的另一个实施方案中，所述的 YFV 基因组是缺失了部分结构蛋白基因序列的亚基因组，其中，缺失

的结构蛋白基因序列选自下列基因：C 蛋白、prM 蛋白、E 蛋白或其组合。

在本发明中，外源多肽表达组件可以位于黄热病病毒基因组的不同位点。作为非限制性例子，可将外源核酸序列插入以下的一个或多个位置：(1)病毒多肽的 N-末端；(2)病毒蛋白质 C 和 prM 之间；(3)病毒蛋白质 NS2A 和 NS2B 之间；(4)病毒蛋白质 NS2B 和 NS3 之间；(5)病毒蛋白质 NS3 和 NS4A 之间；(5)NS4A 和 NS4B 之间；(6)E 编码区和 NS1 编码区之间。外源核酸可插入黄热病病毒基因组的其它位点。最好是，外源核酸的插入不破坏黄热病病毒蛋白质的功能、和/或病毒多肽的蛋白水解加工、和/或病毒的复制。

以 SARS 抗原性多肽为例，当使用本发明的黄热病病毒载体感染宿主细胞时，重组的黄热病病毒编码含有 SARS 冠状病毒的抗原多肽的重组多蛋白前体。该重组多蛋白前体通过 2A 自身水解酶和/或信号肽水解酶酶解加工，从而释放出 SARS 冠状病毒的抗原多肽。用重组后的黄热病病毒感染宿主细胞，可在宿主细胞中提供 SARS 冠状病毒抗原性多肽的编码序列，并产生相应的抗原多肽，从而引发针对 SARS 冠状病毒抗原多肽的免疫反应。因此，本发明的重组的黄热病病毒载体可用作预防 SARS 的疫苗。

与仅可产生一轮抗原病毒表达的其它载体和/或会停止表达的其它载体不同，本发明的活性重组病毒会持续繁殖直到免疫系统被充分活化从而制止感染。与用常规表达载体(如病毒复制子)所引发的免疫应答相比，这样就会产生更强的(针对 SARS 抗原性肽)的免疫应答。

20 药物组合物

本发明还提供了包含本发明的重组黄热病病毒的各种组合物，包括药用组合物，尤其是疫苗组合物。

包含本发明的重组黄热病病毒的各种组合物可以包含按重组黄热病病毒的实际用途所选用的缓冲剂；还可包含适用于预定用途的其它物质。本领域技术人员都善于选择的缓冲剂，本领域已知有多种缓冲剂适用于预定用途。在有些实例中，该组合物可含有药学上可接受的赋形剂，本领域已知有多种而无需在此详细讨论。药学上可接受的各种赋形剂在多种出版物已有详述，包括如“Remington: 药理学和药理学实践”，第 19 版(1995)Mack Publishing Co.。

可将药用组合物制备成各种剂型，如注射剂、粒剂、片剂、丸剂、栓剂、胶囊、悬浮液、喷雾、栓剂、透皮药物(如贴片等)、油膏、洗剂等。适用于口服或局部使用的药用级别的有机或无机载体和/或稀释剂，可用于配制包含治疗活性化合物的各种组合物。本领域已知的稀释剂包括水性介质、植物性和动物性油和脂肪。还可使用稳定剂、润湿剂和乳化剂、改变渗透压的盐类或维持合适 pH 值的各种缓冲剂、和皮肤渗透增强剂等作为辅助性材料。

当用作疫苗时，本发明的重组黄热病病毒可采用各种方法进行配制。通常，按本领域熟知的各种方法，用合适的药用载体和/或运载体(vehicle)配制本发明的疫苗。合适的载体是无菌盐水。为此也可使用其它水性和非水性等渗无菌注射液以及水性和非水性

无菌悬浮液(已知都是本领域技术人员所熟知的药学上可接受的载体)。

另外, 本发明的疫苗组合物的配制还可含有其它成分, 包括如佐剂、稳定剂、pH 调节剂、防腐剂等。这些成分是疫苗领域技术人员所熟知的。佐剂类包括(但不限于)铝盐佐剂; 皂苷佐剂; Ribi 佐剂(Ribi ImmunoChem Research In., Hamilton, MT); Montanide ISA 佐剂(Seppic, Paris, France); Hunter's TiterMax 佐剂(CytRx Corp., Norcross, GA); Gerbu 佐剂(Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg, Germany)等。另外, 在制剂中也可包含调节免疫应答的其它成分。

给药途径和剂量

10 当用作疫苗时, 可用已知的方法将本发明的重组黄热病病毒施用于个体。通常采用与常规疫苗相同的施用途和/或模拟病原体感染路径施用这些疫苗。可以采用疫苗组合物的形式时, 除有重组 YFV 病毒以外, 还可包括药学上可接受的载体。此外, 这种组合物还可包括佐剂、矫味剂或稳定剂等。

15 给药的常规和药学上可接受的途径包括: 鼻内、肌内、气管内、皮下、皮内、肺内、静脉内、经鼻、经口服或其它肠胃外给药途径。如果需要可以组合给药途径, 或按抗原肽或疾病情况进行调节。疫苗组合物可以单剂量或多剂量给予, 且可以包括给予加强剂量以引发和/或维持免疫力。

应以“有效量”给予重组黄热病病毒疫苗, 即重组黄热病病毒的量在所选用的给药路径中足以引发免疫应答, 能有效促使保护宿主抵抗 SARS 病毒感染或 SARS 症状。

20 在各疫苗剂份中所选用的重组黄热病病毒的量, 是按可引发免疫保护性应答而无明显的副作用的量而定。通常, 在感染宿主细胞后, 各剂份的疫苗足以产生约 1-1000 μ g, 较佳地为 1-200 μ g, 更佳地 10-100 μ g 蛋白质。以重组黄热病病毒核酸为基础计算的疫苗有效剂量, 通常包括给予约 1-1000 μ g 核酸。另外, 重组黄热病病毒疫苗的有效剂量的一般范围为约 10^2 - 10^7 , 10^3 - 10^6 或 10^4 - 10^5 空斑形成单位(PFU)。可用包括观察对象中的抗体滴定度和其它反应的标准研究方法来确定具体疫苗的最佳用量可通过。监控疫苗提供的免疫力水平来确定是否需要增强剂量。在评估了血清中的抗体滴定度后, 可能需要选用增强剂量免疫接种。施用佐剂和/或免疫刺激剂就可提高对本发明的蛋白质的免疫应答。

30 与现有技术相对, 本发明的主要优点在于:

(1) 安全性好。作为载体病毒, 黄热病病毒是 WHO 认定的标准安全疫苗, 已应用近七十年, 副反应发生率接近千万分之一。

(2) 免疫效果好。一次接种几天即可见效, 并可长期保持免疫力(通常 10 年以上)。

(3) 中国人体内没有黄热病病毒抗体, 基本上不会影响疫苗的效果。

35 (4) 适合生产, 生产工艺和质量标准容易建立, 利用现有设施生产, 生产成本低。

(5) 本发明释放元件对长的外源多肽的释放效率更高, 与缺失部分结构基因的 YFV 结合可以表达 500 氨基酸或更长的外源多肽。

- 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1

黄热病病毒疫苗的全长 cDNA 克隆的制备

构建过程如图 1、图 2、图 3 所示：

1. 把全长的黄热病病毒疫苗 cDNA 整合到 pRS424 质粒(Plasmid)内，所述的黄热病病毒疫苗 Yellow Fever virus Strain 17D(YF 17D)和 pRS424 质粒(ATCC#: 77105)，购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

- a) 用 RT-PCR 的方法把黄热病病毒 YF 17D 的 RNA 转化成三段黄热病病毒 cDNA 片段(5' 端 cDNA, 3' 端 cDNA 和中间段 cDNA)，在 5' 端 cDNA 片段的 5' 端加上 Not I 酶切位点和 Sp6 增强子序列；在 5' 端 cDNA 片段的 3' 端是 YF cDNA 的 EcoR I 酶切位点；在 3' 端片段的 3' 端加上 Xho I 酶切位点；在中间片段的两头包括部分与 5' 端 cDNA 片段的 3' 端和 3' 端 cDNA 片段的 5' 端相同的基因序列。

所使用的 DNA 引物的序列如下：

引物	序列(5' -3')	SEQ ID NO:
1a.	cgcgccgcccgcatttaggtgacactatagagtaaattcctgtgtgctaatt	4
1b.	caccgtatgaattcctttccc	5
2a.	ggagacaccgcctgggatttc	6
2b.	cacgtagtacatttcattgagt	7
3a.	ccatacatgccagatgttcttgagaaactggaattgctccaa	8
3b.	cccctcgagtggttttgtgtttgtcatcca	9

- b) 获得三个黄热病病毒片段，长度分别为 2280bp，6130bp，和 2580bp。
c) 先把 5' 端片段，然后把 3' 端片段，通过连接的方法克隆到 pRS424 质粒内。
d) 利用在酵母菌中相同序列的 DNA 重组，把中间片段 cDNA 插到上述克隆中，产生全长的黄热病病毒 cDNA 克隆。

实施例 2

制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 NS2B 和 NS3 之间的经口蹄疫病毒的基因片段(2A)修饰的 SARS 疫苗(插入位点为黄热病病毒基因组的 4572-4573nt)。

构建过程如图 4 所示。

1. 把实施例 1 获得的全长的黄热病病毒 cDNA 克隆用 Kpn I 内切酶和 Nhe I 内切酶切去一约 2.2kb 长的片段，此片段包括黄热病病毒 cDNA 序列第 3445-5576 位的碱基。
2. 以黄热病病毒 cDNA 克隆为模板，分别以 GGATACAAGGTCAGACGAAC(SEQ ID NO:10)

- 和 AACCATCGATTCTGGGGCCAGGGTTGGACTCGTCTCCCGCAAGCTTAAGAAGGTCA AAATTCAACAGCTGCA
TATGCCACAAGACATCCCCACTTCTC(SEQ ID NO:11)为一对引物;并以 AACCTGGCCCCG
AATCGATGGTTCGAGGCGCGCGACGCAGCGGTGACGTACTCTGGGATAT TCCCACTCCTAAGATCATC(SEQ ID
NO:12)和 CGCTGCCCAACCTCTAGCGGC(SEQ ID NO:13)为另一对引物,然后用 PCR 的方法产
5 生两个 DNA 片段,在其中引入一个 2A 的基因序列,所述的 2A 的基因序列是口蹄疫病毒
的基因片段,由六十个碱基组成,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。再以溶合 PCR 的
方法将上述两个 DNA 片段连结成在 NS2B 和 NS3 基因之间内含口蹄疫病毒的 2A 的 DNA 片
段,其 5' 端和 3' 端包括大约 50bp 的 DNA 序列分别与 Kpn I 酶切点和 Nhe I 酶切点相邻
序列相同。
- 10 3. 把步骤 1 中所述的切去约 2.2kb 长片段的黄热病病毒 cDNA 片段和步骤 2 中产生
的 DNA 片段用来转化酵母菌,在酵母菌的 DNA 复制的过程中,上述片段能够自动整合产
生重组的黄热病病毒 cDNA。
4. 含 SARS 冠状病毒(SARS coronavirus)S1 基因的 DNA 质粒 B21 和 H21 可从 British
Columbia Cancer Agency, Canada 获得。S1 基因的全序列如 SEQ ID NO:3 所示。
- 15 以 CAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTGGCCGGCGATGTGGAATCAAATCCCGGGCTATGTTT
ATTTTCTTATTATTCTT(SEQ ID NO:14)和 GGTGGGTGCAAGGTTGCCATCA(SEQ ID NO:15)为引
物,以 DNA 质粒 B21 为模板,用 PCR 的方法产生 SARS 冠状病毒 S1 抗原 5' 端的部分 DNA
片段。以 CCTTTGAGAGACATATCTAATG(SEQ ID NO:16)和 GGGGCCAGGGTTGGAC
TCGACGTCTCCCGCAAGCTTAAGCAGATCGAAGTTCAGGAGTTGCTCAGCTCCTATAAGACAGCC(SEQ ID
20 NO:17)为引物,以 DNA 质粒 H21 为模板,用 PCR 的方法产生 SARS 冠状病毒 S1 抗原 3' 端
的部分 DNA 片段。再以溶合 PCR 的方法将上述两个 DNA 片段连结成完整的 S1 DNA 片段
(SARS 冠状病毒-S1-2A),其 5' 端和 3' 端包括 2A 的序列。
5. 用 Afl II 内切酶将步骤 3 中产生的重组黄热病病毒 cDNA 线性化。
6. 把线性化的重组黄热病病毒 cDNA 和步骤 4 中产生的 SARS 冠状病毒-S1-2A 片段
25 用来转化酵母菌,在酵母菌的 DNA 复制的过程中,SARS 冠状病毒-S1-2A 片段能够自动
整合产生重组的黄热病病毒(简称重组黄热病病毒, rYFV) cDNA。
7. 用 XhoI 内切酶将步骤 6 中产生的重组黄热病病毒 cDNA 线性化。
8. 用 DNA 依赖性 Sp6 RNA 聚合酶(DNA dependent Sp6 RNA polymerase)将线性化
的重组黄热病病毒 cDNA 转录成 RNA。
- 30 9. 用电穿孔法(electroporation),把重组黄热病病毒 RNA 转染入宿主细胞 BHK-
21(Baby hamster kidney)(购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),ATCC#:CCL-10)。7-10
天后收集上清,得到重组的黄热病病毒颗粒(rYFV)。

实施例 3

- 35 制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS1 之间的经口蹄疫病毒的基因片段(2A)修饰
的 SARS 疫苗(插入位点为黄热病病毒基因组的 2453-2454nt)
构建过程如图 5 所示。

1. 把全长的黄热病病毒 cDNA 克隆用 Pst I 切去一约 1kb 长的片段。此片段包括黄热病病毒 cDNA 序列第 1959-2782 位。

2. 以黄热病病毒 cDNA 克隆为模板, 分别以 GTCAAGAACCCAACTGACACT (SEQ ID NO:18) 和 AAGGTCAAAATTCAACAGCTGAAAGAAGATGGCGCATCCTTG (SEQ ID NO:19) 为一对引物; 并以 CAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTTGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGCCCCAACATGACAAT GTCCATGAGC (SEQ ID NO:20) 和 CCAGACCCGTTTGAAAACGG (SEQ ID NO:21) 为另一对引物, 然后用 PCR 的方法产生两个 DNA 片段, 在其中引入一个 2A 的基因序列, 所述的 2A 的基因序列是口蹄疫病毒的基因片段 (SEQ ID NO:1)。再以溶合 PCR 的方法将上述两个 DNA 片段连结产生一段在 E 和 NS1 基因之间内含口蹄疫病毒的 2A 的 DNA 片段, 其 5' 端和 3' 端包括大约 50bp 的序列分别与 Pst I 相邻序列相同。

3. 把步骤 1 中所述的切去约 1kb 长片段的黄热病病毒 cDNA 片段和步骤 2 中产生的 DNA 片段用来转化酵母菌, 在酵母菌的 DNA 复制的过程中, 上述片段能够自动整合产生重组的黄热病病毒 cDNA。

4. 按实施例 2 步骤 4 相同方法, 获得完整的 S1 DNA 片段 (SARS 冠状病毒-S1-2A), 其 5' 端和 3' 端包括 2A 的序列。

5. 用 Afl II 内切酶将步骤 3 中产生的重组黄热病病毒 cDNA 线性化。

6. 把线性化的重组黄热病病毒 cDNA 和步骤 4 中产生的 SARS 冠状病毒-S1-2A 片段用来转化酵母菌, 在酵母菌的 DNA 复制的过程中, SARS 冠状病毒-S1-2A 片段能够自动整合产生重组的黄热病病毒 cDNA。

7. 用 XhoI 内切酶将步骤 6 中产生的重组黄热病病毒 cDNA 线性化。

8. 用 DNA 依赖性 Sp6 RNA 聚合酶将线性化的重组黄热病病毒 cDNA 转录成 RNA。

9. 用电穿孔法, 把重组黄热病病毒 RNA 转染入宿主细胞 BHK-21 (ATCC#:CCL-10)。7-10 天后收集上清, 得到重组的黄热病病毒颗粒。

25 实施例 4

制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS1 之间的经口蹄疫病毒的基因片段 (2A) 和信号肽水解酶底物的基因片段修饰的 SARS 疫苗 (插入位点为黄热病病毒基因组的 2453-2454nt)

构建过程如图 6 所示。

1. 把全长的黄热病病毒 cDNA 克隆用 Pst I 切去一约 1kb 长的片段。此片段包括黄热病病毒 cDNA 序列 1959-2782。

2. 按实施例 3 步骤 2 相同方法, 获得一段在 E 和 NS1 基因之间内含口蹄疫病毒的 2A 的 DNA 片段, 其 5' 端和 3' 端包括大约 50bp 的序列分别与 Pst I 相邻序列相同。

3. 把步骤 1 中所述的切去约 1kb 长片段的黄热病病毒 cDNA 片段和步骤 2 中产生的 DNA 片段用来转化酵母菌, 在酵母菌的 DNA 复制的过程中, 上述片段能够自动整合产生重组的黄热病病毒 cDNA。

4. 以 AGCATGATCTTGTTAGGAGTGATCATGATGTTTTTGTCTCCACAAGCCCAAGCCAGTG

ACCTTGACCGGTGCACCACT(SEQ ID NO:22)和GGTGGGGTGCAAGGTTTGCCATCA(SEQ ID NO:14)为引物,以DNA质粒B21为模板,用PCR的方法产生SARS冠状病毒S1抗原5'端的部分DNA片段,同时在其5'端插入了修饰过的信号肽水解酶底物的基因片段序列(即SEQ ID NO:22中第40-54位,编码序列如SEQ ID NO:2所示的信号肽水解酶底物);以

5 CCTTTGAGAGAGACATATCTAATG(SEQ ID NO:16)和GGGGCCAGGGTTGACTCGACGTCTCCC

GCAAGCTTAAGCAGATCGAAGTTCAGGAGTTGCTCAGCTCCTATAAGACAGCC(SEQ ID NO:17)为引物,以DNA质粒H21为模板,用PCR的方法产生SARS冠状病毒S1抗原3'端的部分DNA片段。再以溶合PCR的方法将上述两个DNA片段连结成完整的S1 DNA片段(SARS冠状病毒-S1-2A),其5'端包括黄热病病毒的蛋白质E的3'端序列和修饰过的信号肽水解酶底物

10 基因片段,其3'端包括2A的序列。

5. 用Afl II内切酶将步骤3中产生的重组黄热病病毒cDNA线性化。

6. 把线性化的重组黄热病病毒cDNA和步骤4中产生的SARS冠状病毒-S1-2A片段用来转化酵母菌,在酵母菌的DNA复制的过程中,SARS冠状病毒-S1-2A片段能够自动整合产生重组的黄热病病毒cDNA。

15 7. 用XhoI内切酶将步骤6中产生的重组黄热病病毒cDNA线性化。

8. 用DNA依赖性Sp6 RNA聚合酶将线性化的重组黄热病病毒cDNA转录成RNA。

9. 用电穿孔法(electroporation),把重组黄热病病毒RNA转染入宿主细胞BHK-21(ATCC#CCL-10)。7-10天后收集上清,得到重组的黄热病病毒颗粒。

20 实施例5:

制备插入点在黄热病病毒cDNA的C和prM之间的经口蹄疫病毒的基因片段(2A)修饰的SARS疫苗(插入位点为黄热病病毒基因组的482-483nt)

构建过程如图7所示。

1. 把全长的黄热病病毒cDNA克隆用Bsm I切去一约1kb长的片段。此片段包括

25 黄热病病毒cDNA序列458-1514。

2. 以黄热病病毒cDNA克隆为模板,分别以GCCAGTTTGATGAGAGGATTG(SEQ ID NO:23)和AGGGTTGACTCGACGTCTCCGCAAGCTTAAGAAGGTCAAAATTCAACAGCTGCACTCCACCCGTCATCAACAG(SEQ ID NO:24)为一对引物;并以GGAGACGTCGAGTCCAACCCTGGCCCCCTCCCATGATGTCTGACTGTG(SEQ ID NO:25)和CTCTCTCCACACCCCGCCACT(SEQ ID NO:26)为另一对引物,然后

30 用PCR的方法产生两个DNA片段,在其中引入一个2A的基因序列(SEQ ID NO:1)。再以溶合PCR的方法将上述两个DNA片段连结产生一段在C和prM基因之间内含口蹄疫病毒的2A的DNA片段,其5'端和3'端包括大约50bp的序列分别与Bsm I相邻序列相同。

3. 把步骤1中所述的切去约1 kb长片段的黄热病病毒cDNA片段和步骤2中产生的DNA片段用来转化酵母菌,在酵母菌的DNA复制的过程中,上述片段能够自动整合产生

35 重组的黄热病病毒cDNA。

4. 以TTCCTAATTTTGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTGAGTGACCTTGACCGGTGCACCACT(SEQ ID NO:27)和GGTGGGGTGCAAGGTTTGCCATCA(SEQ ID NO:28)为引物,以

DNA 质粒 B21 为模板, 用 PCR 的方法产生 SARS 冠状病毒 S1 抗原 5' 端的部分 DNA 片段。

以 CCTTTGAGAGAGACATATCTAATG (SEQ ID NO:16) 和 GGGGCCAGGGTTGGACTCGACG

TCTCCCGCAAGCTTAAGCAGATCGAAGTTCAGGAGTTGCTCAGCTCCTATAAGACAGCC (SEQ ID NO:17) 为

引物, 以 DNA 质粒 H21 为模板, 用 PCR 的方法产生 SARS 冠状病毒 S1 抗原 3' 端的部分 DNA

- 5 片段。再以溶合 PCR 的方法将上述两个 DNA 片段连结成完整的 S1 DNA 片段 (SARS 冠状病毒-S1-2A), 其 5' 端包括黄热病病毒的蛋白质 C 的 3' 端序列, 其 3' 端包括 2A 的序列。

5. 用 *Afl* II 内切酶将步骤 3 中产生的重组黄热病病毒 cDNA 线性化。

6. 把线性化的重组黄热病病毒 cDNA 和步骤 4 中产生的 SARS 冠状病毒-S1-2A 片段用来转化酵母菌, 在酵母菌的 DNA 复制的过程中, SARS 冠状病毒-S1-2A 片段能够自动
10 整合产生重组的黄热病病毒 cDNA。

7. 用 *Xho*I 内切酶将步骤 6 中产生的重组黄热病病毒 cDNA 线性化。

8. 用 DNA 依赖性 Sp6 RNA 聚合酶将线性化的重组黄热病病毒 cDNA 转录成 RNA。

9. 用电穿孔法, 把重组黄热病病毒 RNA 转染入宿主细胞 BHK-21 (ATCC#:CCL-10)。7-10 天后收集上清, 得到重组的黄热病病毒颗粒。

15

实施例 6:

制备重组 YFV 亚基因组

本实施例制备去除了 YFV 结构蛋白 C 序列的 cDNA 克隆。

1. 将实施例 5 得到的含有 SARS 冠状病毒-S1 序列的重组黄热病病毒 cDNA 克隆用 *Not* I
20 I 切成线性。

2. 用常规的融合 PCR 方法, 制得长 384bp 碱基的 DNA 片段, 该片段对应于黄热病毒结构蛋白 C 基因但缺失了第 179-409 位核苷酸序列。

3. 将线性的重组黄热病毒 cDNA 和 384bp 的 cDNA 片段转化酵母菌 (ATCC 76628), 得到去除了 YFV 结构蛋白 C 序列的重组黄热病毒 cDNA 克隆 (Δ C-rYFV cDNA)。

- 25 4. 用 *Kpn*I 内切酶将步骤 3 中产生的 Δ C-rYFV cDNA 线性化。

5. 用 DNA 依赖性 Sp6 RNA 聚合酶 (DNA dependent Sp6 RNA polymerase) 将线性化的 Δ C rYFV cDNA 转录成 RNA, 即 Δ C-rYFV RNA。

实施例 7:

- 30 制备含有 YFV 亚基因组的 SARS 疫苗

参见图 8。

1. 以 pCI (购自 PROMEGA, USA) 作为模板, 以 5' *CMV* 和 3' *CMV* 作为引物, 用 PCR 方法制备 *CMV* (cytomegalovirus, 巨细胞病毒) 的 DNA 片段 (简称 *CMV*)。 *CMV* 作为早期增强子和启动子, 其长度为 631bp。以实施例 1 得到的全长黄热病毒 cDNA 克隆为模板, 以
35 5' *YFV*5' end 和 3' *YFV*5' end 作为引物, 用 PCR 的方法制备 YFV cDNA 的 5' 端片段 (简称 YFV5' end)。以上述 2 个 DNA 片段作为模板, 以 5' *CMV* 和 3' *YFV*5' end 作为引物, 用 fusing PCR 的方法制备 *CMV*-YFV 5' end 的 DNA 片段 (简称 *CMV*-YFV 5' end)。

2. 将步骤 1 产生的 CMV-YFV 5' end 与 pRS424 质粒 (ATCC#: 77105) 用 Not I 和 Apa I 进行酶切。用 Qiagen spin column (购自 QIAGEN Inc.) 对消化产物进行纯化。将上述两个 DNA 片段用 T4 连接酶 (购自 New England Bio lab) 连接, 并转化至大肠杆菌内。筛选得到 CMV-YFV 5' end 克隆 (简称 pRS/CMV-YFV 5' end)。

- 5 3. 以实施例 1 得到的全长黄热病毒 cDNA 为模板, 以 5' YFV3' end 和 3' YFV3' end 作为引物, 用 PCR 方法制备 YFV cDNA 的 3' 端片段 (简称 YFV 3' end)。以 5' HDVr 和 3' HDVr 作为引物, 用融合 PCR 方法制备肝炎 delta 病毒抗原血症核酶 (hepatitis delta virus antigenomic ribozyme, HDVr) 的 DNA 片段 (简称 HDVr)。以 pcDNA3 (购自 Invitrogen) 作为模板, 以 5' pA 和 3' pA 作为引物, 用 PCR 的方法制备牛生长激素 poly A (bovine growth hormone poly A, BGH pA) 的 DNA 片段 (简称 pA)。以上三个片段为模板, 以 10 5' YFV3' end 和 3' pA 作为引物, 用融合 PCR 方法制备 YFV 3' end-HDVr-pA 的 DNA 片段。

引物名称	引物序列 (5' -3')	SEQ ID NO:
5' CMV	AAATATGCGGCCCTTGACATTGATTATTGACTAGTIA	27
3' CMV	AATTAGCACACAGGATTTACTCGGTTCACTAAACGAGCTCTG	28
5' YFV5' end	AGTAAATCCTGTGTGCTAATT	29
3' YFV5' end	TACCACCACGTGGGCTGTGATCTTTTTTCC	30
5' YFV3' end	ATCACAGCCACGTGGTGGTAGAAAGACGG	31
3' YFV3' end	GTGGAGATGCCATGCCGACCCAGTGTTTGTGTTTGTGCATC	32
5' HDVr	GGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCG	33
3' HDVr	CTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCCTCCTTCGGATGCCAGGTCCGACC	34
5' pA	CCACTCGGATGGCTAAGGGAGCTAGAGCTCGTGATCAGCCT	35
3' pA	TATATCCGCGGAGAATAGAATGACACCTACTC	36

4. 将上述步骤 2 生成的 pRS/CMV-YFV5' end 与步骤 3 生成的 YFV3' end-HDVr-pA 的 DNA 片段用 Pml I 和 Sac II 进行酶切, 用 Qiagen spin column 对消化产物进行纯化。15 将上述两个 DNA 片段用 T4 连接酶连接, 并转化至大肠杆菌内。筛选得到 pRS/CMV-YFV5' end-YFV3' end-HDVr-pA 的克隆。

5. 将上述步骤 4 生成的 pRS/CMV-YFV5' end-YFV3' end-HDVr-pA 的克隆用 Pml I 进行酶切, 将实施例 1 得到的全长黄热病毒 cDNA 克隆用 NotI 和 Kpn I 进行酶切。将上述酶切产物进行纯化, 并将纯化产物转化至酿酒酵母, 利用在酵母菌中相同序列的 DNA 重组, 20 得到修饰后的全长 YFVcDNA 克隆 (简称 pRS/CMV/YFV)。

6. 将步骤 5 产生的 pRS/CMV/YFV 用 Stu I 进行酶切, 得到线性的 pRS/CMV/YFV 克隆。以 GTGAAGGAAGAAGGAAAGGAGGAGCTCCAAGAGATCCCGCCTGAGGAACATGAGATCTTG (SEQ ID NO: 37) 和 TGTTTCACCGCTGTCAATTCAAGATCTCATGTTTCTCAGG (SEQ ID NO: 38) 为引物, 用融合 PCR 方法生成一个 78bp 长的 DNA 片段, 其序列为 25 GTGAAGGAAGAAGGAAAGGAGGAGCTCCAAGAGATCCCGCCTGAGGAACATGAGATCTTGAATGACAGCGGTGAAACA (SEQ ID NO: 39)。将上述线性的 pRS/CMV/YFV 克隆和 78bp 长的 DNA 片段一同转化

至酵母菌(ATCC 76628), 利用在酵母菌中相同序列的 DNA 重组, 将线性的 pRS/CMV/YFV 克隆中部分 YFV NS3 编码区基因序列(nt 5126-6280)切除, 得到 NS3 缺失的 YFV cDNA 克隆。

- 5 将上述步骤 6 产生的 NS3 缺失的 YFV cDNA 克隆和 pcDNA3(购自 INVITROGEN)同时转染 BHK-21 cell(ATCC#:CCL-10)。该细胞培养一天后, 转换为含有 G418(购自 SIGMA)的细胞培养液。用实施例 6 得到的 ΔC rYFV RNA 转化抗 G418 细胞株, 挑选出包装细胞系。该细胞系的产量可以达到每毫升 10^6 重组黄热病毒颗粒(ΔC - rYFV), 即 SARS 疫苗。

实施例 8

- 10 制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 NS2B 和 NS3 之间的经口蹄疫病毒的基因片段(2A)修饰的 HBV 疫苗(插入位点为黄热病病毒基因组的 4572-4573nt)

重复实施例 2 的步骤 1-9, 不同点仅在于用 HBV 抗原多肽替换 SARS 抗原多肽。具体地, 在步骤 4 中, 以 CAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTGGCCGGCGATGTGGAAT CAAATCCCGGGCCTATGGAGAACATCACATCAGGATTC(SEQ ID NO:40)和 GGGGCCAGGGTTGGA

- 15 CTCGACGTCTCCCGCAAGCTTAAGCAGATCGAAGTTCAGGAGTTGAATGTATACCCAAAGACAAAAGAA(SEQ ID NO:41)为引物, 以 HBV 表面抗原(HBVsAg)基因的 DNA 质粒(ATCC # 45020D)为模板, 用常规 PCR 的方法产生 HBVsAg DNA 片段(HBVsAg-2A), 其 5' 端和 3' 端包括 2A 的序列。

结果, 得到重组的黄热病病毒颗粒(rYFV), 其中在黄热病病毒 cDNA 的 NS2B 和 NS3 之间插入有 HBVsAg 基因。

20

实施例 9

制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS1 之间的经口蹄疫病毒的基因片段(2A)修饰的 HBV 疫苗(插入位点为黄热病病毒基因组的 2453-2454nt)

- 25 重复实施例 3 的步骤 1-9, 不同点仅在于用 HBV 抗原多肽替换 SARS 抗原多肽。具体地, 在步骤 4 中按实施例 7 步骤 4 相同方法, 获得 HBVsAg DNA 片段(HBVsAg-2A), 其 5' 端和 3' 端包括 2A 的序列。

结果, 得到重组的黄热病病毒颗粒(rYFV), 其中在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS1 之间插入有 HBVsAg 基因。

实施例 10

30 制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS1 之间的经口蹄疫病毒的基因片段(2A)和信号肽水解酶底物的基因片段修饰的 HBV 疫苗(插入位点为黄热病病毒基因组的 2453-2454nt)

- 35 重复实施例 4 的步骤 1-9, 不同点仅在于用 HBV 抗原多肽替换 SARS 抗原多肽。具体地, 在步骤 4 中, 以 AGCATGATCTTGGTAGGAGTGATCATGATGTTTTGTCTCCACAAGCCCAAGCCAT GGAGAACATCACATCAGGATTC (SEQ ID NO:42)和 GGGGCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCAAG CTTAAGCAGATCGAAGTTCAGGAGTTGAATGTATACCCAAAGACAAAAGAA (SEQ ID NO:41)为引物, 以

HBV 表面抗原 (HBVsAg) 基因的 DNA 质粒 (ATCC # 45020D) 为模板, 用 PCR 的方法产生的 HBVsAg DNA 片段 (HBVsAg-2A), 其 5' 端包括黄热病病毒的蛋白质 E 的 3' 端序列和修饰过的信号肽水解酶底物基因片段 (编码如 SEQ ID NO:2 所示的信号肽水解酶底物), PCR 产生的 HBVsAg DNA 片段的 3' 端包括 2A 的序列。

5 结果, 得到重组的黄热病病毒颗粒 (rYFV), 其中在黄热病病毒 cDNA 的 E 和 NS1 之间插入有 HBVsAg 基因。

实施例 11:

10 制备插入点在黄热病病毒 cDNA 的 C 和 prM 之间的经口蹄疫病毒的基因片段 (2A) 和信号肽水解酶底物的基因片段修饰的 HBV 疫苗 (插入位点为黄热病病毒基因组的 482-483nt)

重复实施例 5 的步骤 1-9, 不同点仅在于用 HBV 抗原多肽替换 SARS 抗原多肽, 且 3 端释放元件为信号肽水解酶底物的基因片段。具体地, 在步骤 4 中, 以 TTCCTAATTTTGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTGATGGAGAACATCACATCAGGATTC (SEQ ID NO:43) 和 GGGGCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCCGCAAGCTTAAGCAGATCGAAGTTCAGGAGTT

15 GAATGTATACCCAAAGACAAAAGAA (SEQ ID NO:41) 为引物, 以 HBV 表面抗原 (HBVsAg) 基因的 DNA 质粒 (ATCC # 45020D) 为模板, 用 PCR 的方法产生的 HBVsAg DNA 片段 (HBVsAg-2A), 其 5' 端包括黄热病病毒的蛋白质 C 的 3' 端序列和修饰过的信号肽水解酶底物基因片段, 其 3' 端包括 2A 的序列。

20 结果, 得到重组的黄热病病毒颗粒 (rYFV), 其中在黄热病病毒 cDNA 的 C 和 prM 之间插入有 HBVsAg 基因。

实施例 12:

制备重组 YFV 亚基因组

本实施例制备去除了 YFV 结构蛋白 C 序列的 cDNA 克隆。

25 重复实施例 6 的步骤 1-5, 不同点仅在于用含有 HBsAg 基因序列的重组黄热病病毒 cDNA 克隆替换含有 SARS 冠状病毒-S1 序列的重组黄热病毒 cDNA 克隆。具体地, 在步骤 1 中, 将实施例 11 得到的含有 HBsAg 基因序列的重组黄热病病毒 cDNA 克隆用 Acl I 切成线性。

30 结果, 得到去除了 YFV 结构蛋白 C 序列的 cDNA 克隆 (Δ C-rYFV cDNA), 其中含有 HBsAg 的基因序列, 进而得到 Δ C-rYFV RNA。

实施例 13:

制备含有 YFV 亚基因组的 HBV 疫苗

35 重复实施例 7 的步骤 1-6。然后用实施例 12 得到的 Δ C rYFV RNA 转化实施例 7 得到的抗 G418 细胞株, 获得包装细胞系。该细胞系的产量可以达到每毫升 10^6 重组黄热病病毒颗粒 (Δ C-rYFV), 即 HBV 疫苗。

实施例 14:

小鼠抗 SARS 冠状病毒 IgG 检测

在本实施例中,测试了实施例 2-5 和 7 制备的重组黄热病病毒颗粒(SARS 冠状病毒疫苗)的免疫原性,进行了小鼠抗 SARS 冠状病毒 IgG 检测。方法如下:

5 1. BALB/c 小鼠共 16 只,随机分为两组,每组 8 只。组一于皮下注射 10^6 PFU 重组黄热病病毒颗粒 (0.5ml), 组二注射 10^6 PFU 17D 黄热病病毒疫苗 (0.5ml, 作为对照) 免疫小鼠。分别在注射后第 0 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天从小鼠眼眶采血, 血清在 -70°C 贮存。

10 2. 用 S300 抗原包被酶联板 (S300 为 SARS 冠状病毒 S 蛋白第 14-313 位氨基酸, 是将 S300 表达质粒转化大肠杆菌, 表达出 S300 蛋白片段, 经 Ni-NTA 亲和树脂纯化而制得)。

3. 待检血清 1: 50 稀释, 每孔加稀释后血清样品 100 微升, 37°C 孵育 1h, 洗板 6 次, 每孔加入酶标记抗体 (HRP-山羊抗小鼠 IgG, 1:1000 稀释) 100 微升, 37°C 孵育 45min, 加 TMB/H₂O₂ 显色, 硫酸终止反应后用酶标仪测定 A450/A630。

15 4. 判断标准: 重组黄热病病毒颗粒免疫组小鼠血清的 A450/A630 与对照 17D 黄热病病毒疫苗组血清的平均值大于或等于 2.1 则抗体检测阳性。

检测结果如下:

时间 (天)	0	7	14	21	28
17D-YFV (对照)	0.07	0.11	0.12	0.14	0.15
rYFV(实施例 7 的 SARS 疫苗)	0.06	0.18	0.32	0.43	0.51
平均比值 T	0.9	1.6	2.7	3.1	3.4

结果表明, 在第 14 天就产生了抗 SARS 抗体。实施例 2-5 的 SARS 疫苗也在第 14 天就产生了抗 SARS 抗体 (第 14 天时比值 T 为 2.2-2.6 不等)。

20

实施例 15:

小鼠抗 HBs IgG 检测

在本实施例中,测试了实施例 8-11 和 13 制备的重组黄热病病毒颗粒 (HBV 疫苗) 的免疫原性, 进行了小鼠抗 HBs IgG 检测。使用上海科华生物工程股份有限公司的酶免疫法检测 HBsAg 试剂盒, 测定血清样品中抗-HBs IgG 的效价, 测试方法如下:

25 1. BALB/c 小鼠共 8 只, 随机分为两组, 每组 4 只。组一于左胫前肌肉注射 10^5 PFU 重组黄热病病毒颗粒 (0.5ml), 组二注射 10^5 PFU 17D 黄热病病毒疫苗 (0.5ml) 免疫小鼠。2 周后加强免疫一次, 剂量同第一次。免疫后每天观测小鼠, 并于加强免疫注射 3 周后摘除眼球取血, 分离血清后置 -20°C 待检。

30 2. 待检血清 1: 50 稀释, 每孔加稀释后血清样品 50 微升, 并设阳性及空白对照。

3. 每孔加入酶结合物 1 滴 (空白对照孔除外), 充分混匀, 封板, 置 37°C 孵育 30 分钟。

4. 洗板 6 次, 每孔加入显色剂 A 液、B 液各 1 滴, 充分混匀, 置 37°C 孵育 15 分钟。

5. 硫酸终止反应后用酶标仪测定 A450/A630。

6. 判断标准: 重组黄热病病毒颗粒免疫组小鼠血清的 A450/A630 与对照 17D 黄热病病毒疫苗组血清的平均值大于或等于 2.1 则抗体检测阳性。

检测结果如下:

时间 (天)	0	14	35
17D-YFV (对照)	0.01	0.06	0.12
rYFV (实施例 13 的 HBV 疫苗)	0.01	0.07	0.35
平均比值 T	1.0	1.2	2.9

5 结果表明, 在第 35 天就产生了抗-HBs。实施例 8-11 的 HBV 疫苗也在第 35 天就产生了抗-HBs (第 35 天时比值 T 为 2.1-2.8 不等)。

重组黄热病病毒颗粒 (HBV 疫苗) 免疫 4 周后采血, 分离血清, 测定抗 HBs 平均几何滴度为 650mIU/ml。

10 实施例 16: 黄热病病毒中和抗体测定

黄热病病毒中和抗体测定采用蚀斑减少试验。采集实施例 14、15 中分别用重组黄热病病毒颗粒 (SARS 疫苗)、重组黄热病病毒颗粒 (HBV 疫苗) 和 17D 黄热病病毒疫苗 (对照) 免疫小鼠 7 天后的血清。将三组血清分别与稀释好的黄热病病毒株 (约 200PFU/0.4ml) 等量混合, 同时将稀释好的病毒再 1: 2 稀释, 作为病毒对照, 置 37℃ 水浴作用 90 分钟, 15 接种 6 孔板 BHK21 细胞, 每孔 0.4ml, 37℃ 孵育 90 分钟, 加入含甲基纤维素的培养基覆盖物, 于 CO₂ 孵箱中培育 5 天, 染色, 蚀斑计数, 计算血清蚀斑减数中和效价, 其中, 病毒对照组的蚀斑平均数为 80, 重组黄热病病毒颗粒 (SARS 疫苗) 的抗体中和效价为 1: 20, 重组黄热病病毒颗粒 (HBV 疫苗) 的抗体中和效价为 1: 20, 17D 黄热病病毒疫苗 (阳性对照) 的抗体中和效价为 1: 20。

20 这表明, 重组黄热病病毒颗粒 (SARS 疫苗及 HBV 疫苗) 同 17D 黄热病病毒疫苗一样, 免疫动物后产生的抗体可有效地中和黄热病病毒抗原, 因而是安全的。

25 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种黄热病病毒载体, 其特征在于, 在所述的黄热病病毒的基因组中插入外源多肽表达组件, 所述的表达组件从 5' 至 3' 依次具有以下元件:
 - 5 (a) 5' 端释放元件, 所述的 5' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合;
 - (b) 编码外源多肽的基因元件;
 - (c) 3' 端释放元件, 所述的 3' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合,所述的表达组件插入黄热病病毒基因组的编码区, 且不引起黄热病病毒的基因组序列发生移码。
2. 如权利要求 1 所述的黄热病病毒载体, 其特征在于, 所述的外源多肽是病毒蛋白或癌相关蛋白。
3. 如权利要求 1 所述的黄热病病毒载体, 其特征在于, 所述的外源多肽的基因元件是全长的 SARS-冠状病毒的 S1 基因、N 基因、S 基因、S2 基因、M 基因或上述基因的片段或其组合。
4. 如权利要求 1 所述的黄热病病毒载体, 其特征在于, 所述的表达组件插入黄热病病毒基因组的位点选自下组:
 - 20 (i) NS2B 编码区和 NS3 编码区之间;
 - (ii) E 编码区和 NS1 编码区之间;
 - (iii) C 编码区和 prM 编码区之间。
5. 如权利要求 1 所述的黄热病病毒载体, 其特征在于, 所述的 5' 端释放元件和 3' 端释放元件都是 SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列。
6. 如权利要求 1 所述的黄热病病毒载体, 其特征在于, 所述的 5' 端释放元件是编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列。
7. 如权利要求 1 所述的黄热病病毒载体, 其特征在于, 所述的黄热病病毒基因组缺失了部分黄热病病毒结构蛋白基因序列, 所述的缺失的结构蛋白基因序列选自下组: C 蛋白、prM 蛋白、E 蛋白或其组合。
8. 一种药物组合物, 其特征在于, 它含有权利要求 1 所述的黄热病病毒载体和药学上可接受的载体。
9. 权利要求 1 所述的黄热病病毒载体的用途, 其特征在于, 用于制备预防或治疗性疫苗。
10. 一种制备黄热病病毒的方法, 其特征在于, 包括步骤:
 - 35 (1) 将黄热病病毒基因组引入包装细胞, 其中所述的黄热病病毒基因组中插入了外源多肽表达组件, 所述的表达组件从 5' 至 3' 依次具有以下元件:

(a) 5' 端释放元件, 所述的 5' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合:

(b) 编码外源多肽的基因元件;

5 (c) 3' 端释放元件, 所述的 3' 端释放元件选自: SEQ ID NO:1 所示的编码口蹄疫病毒自身水解酶的核苷酸序列、编码 SEQ ID NO:2 所示信号肽水解酶底物的核苷酸序列, 及其组合,

且所述的基因组缺失了选自下组的结构蛋白基因序列: C 蛋白、prM 蛋白、E 蛋白或其组合, 并且重组后的基因组保留了自我复制功能;

10 而所述的包装细胞选自下组:

(i) 被含所述病毒缺失的结构蛋白基因的质粒转染的细胞,

(ii) 被含所述病毒缺失的结构蛋白基因的辅助病毒载体转染的细胞, 和

(iii) 基因组整合有所述病毒缺失的结构蛋白基因的细胞;

(2) 培养步骤(1)的包装细胞;

15 (3) 从培养物中分离出重组黄热病病毒。

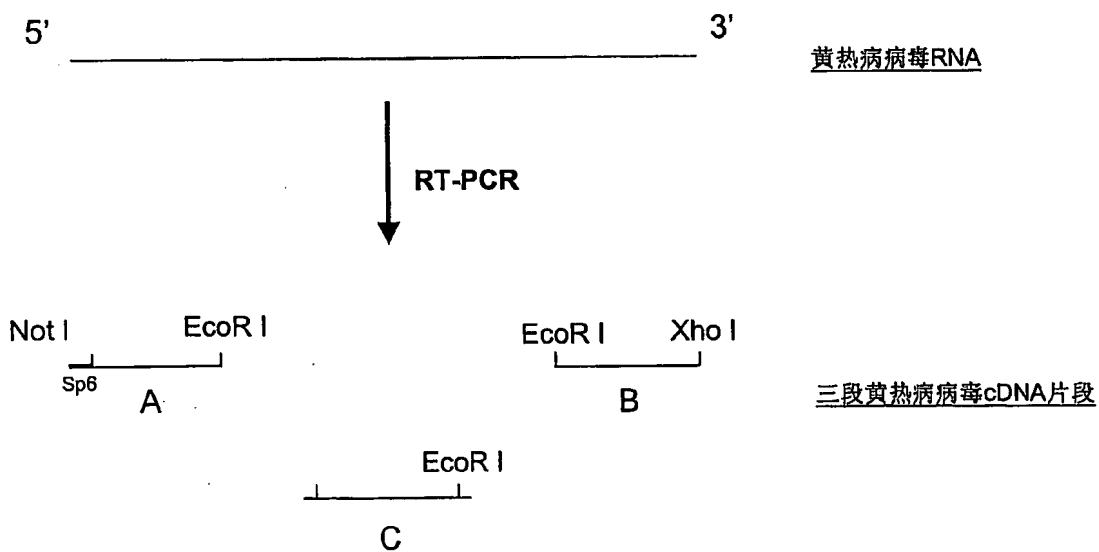
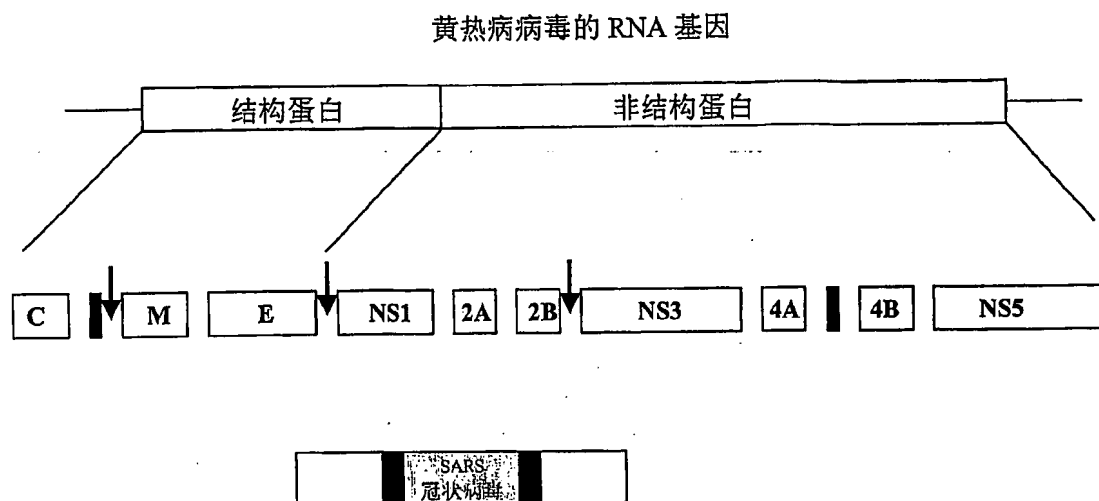


图 2

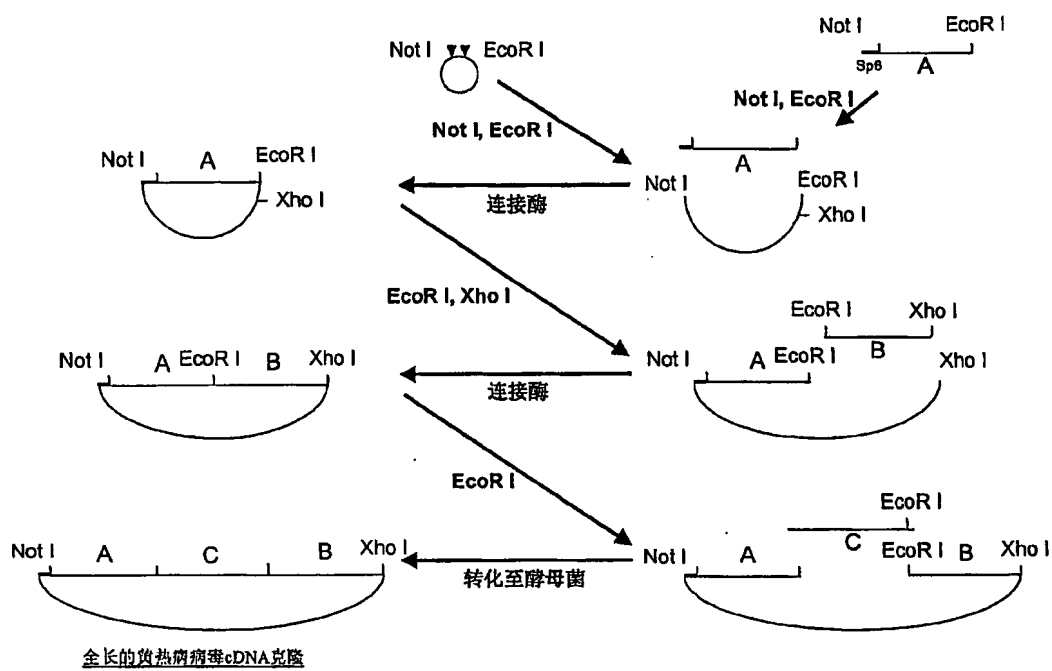


图 3

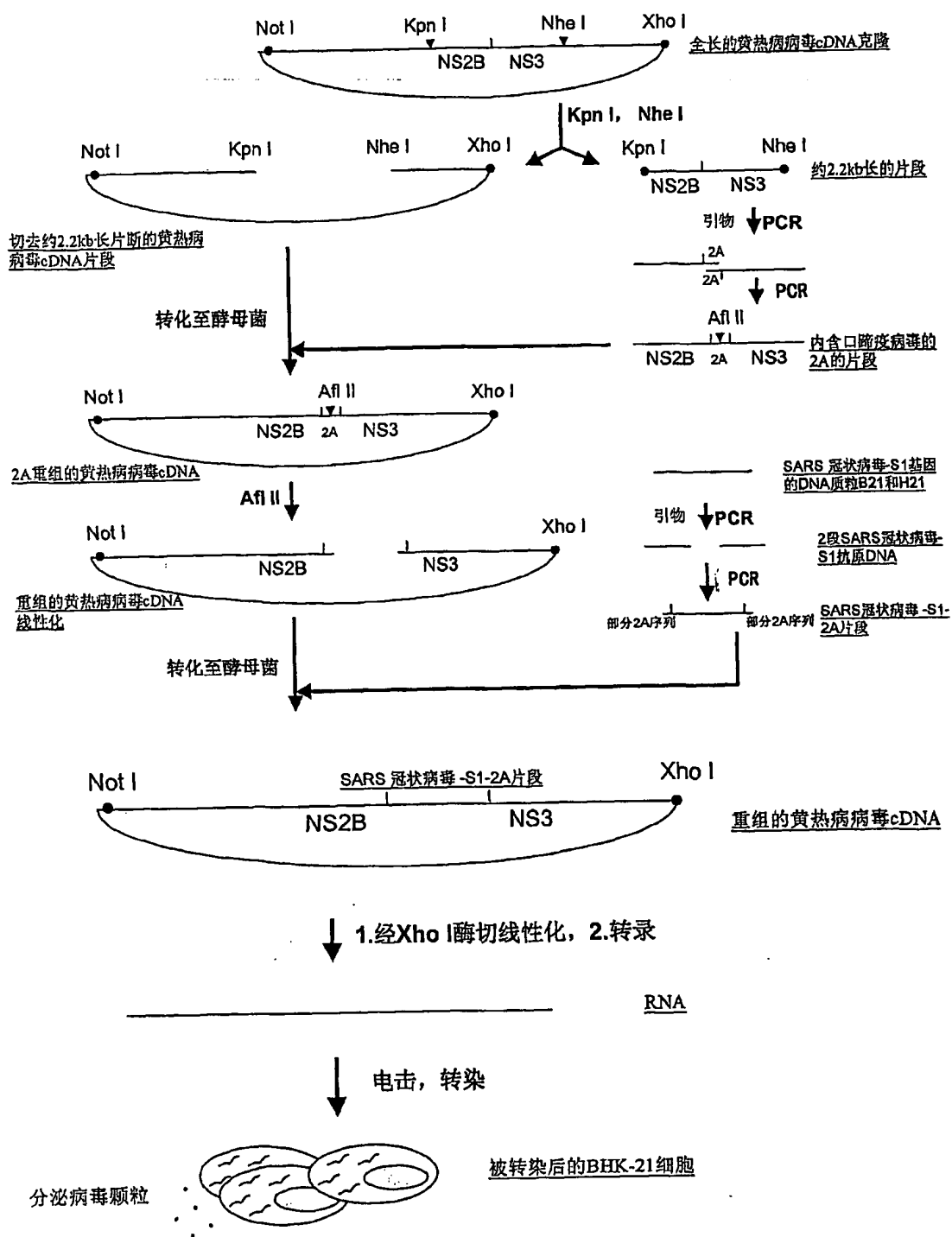


图 4

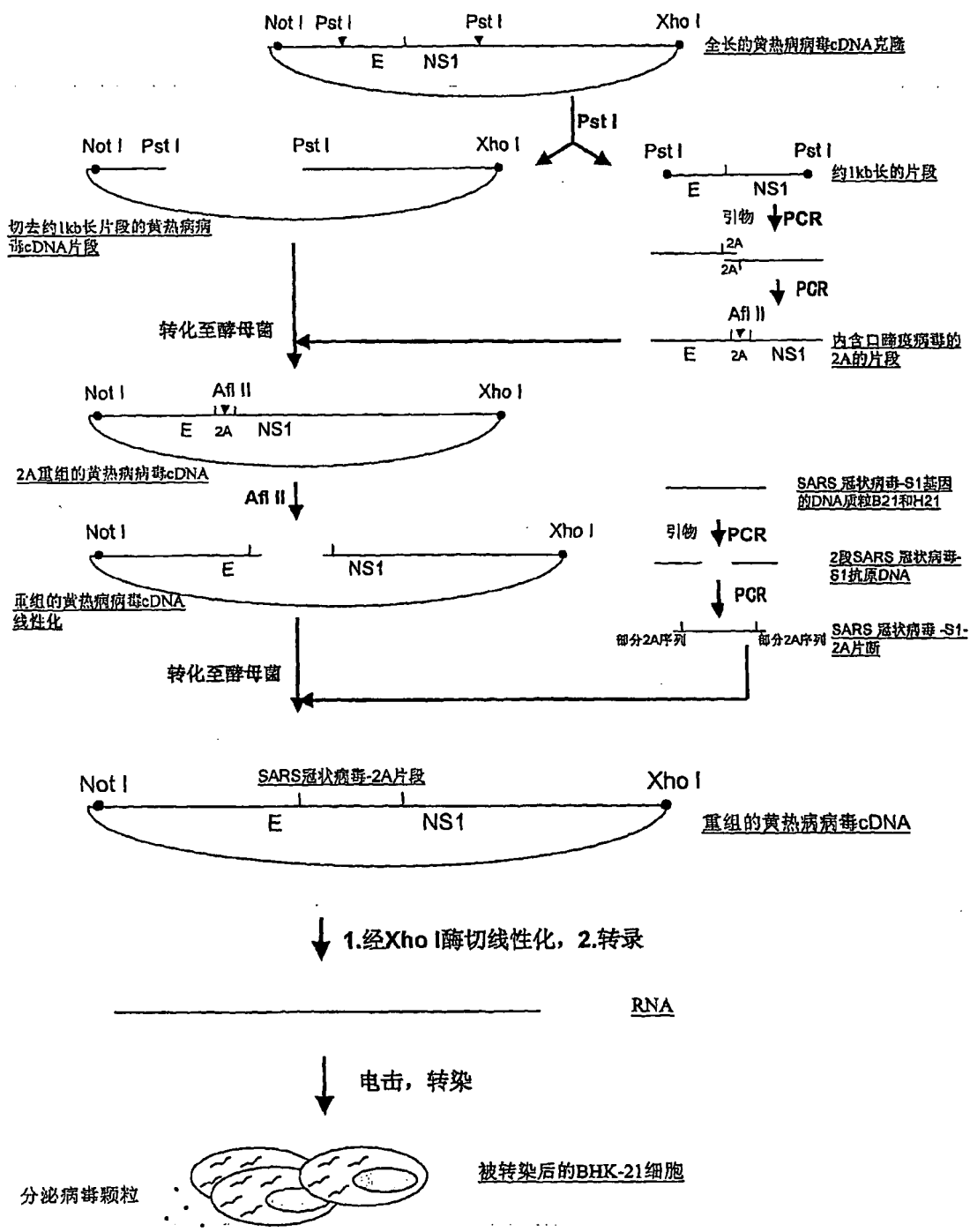


图 5

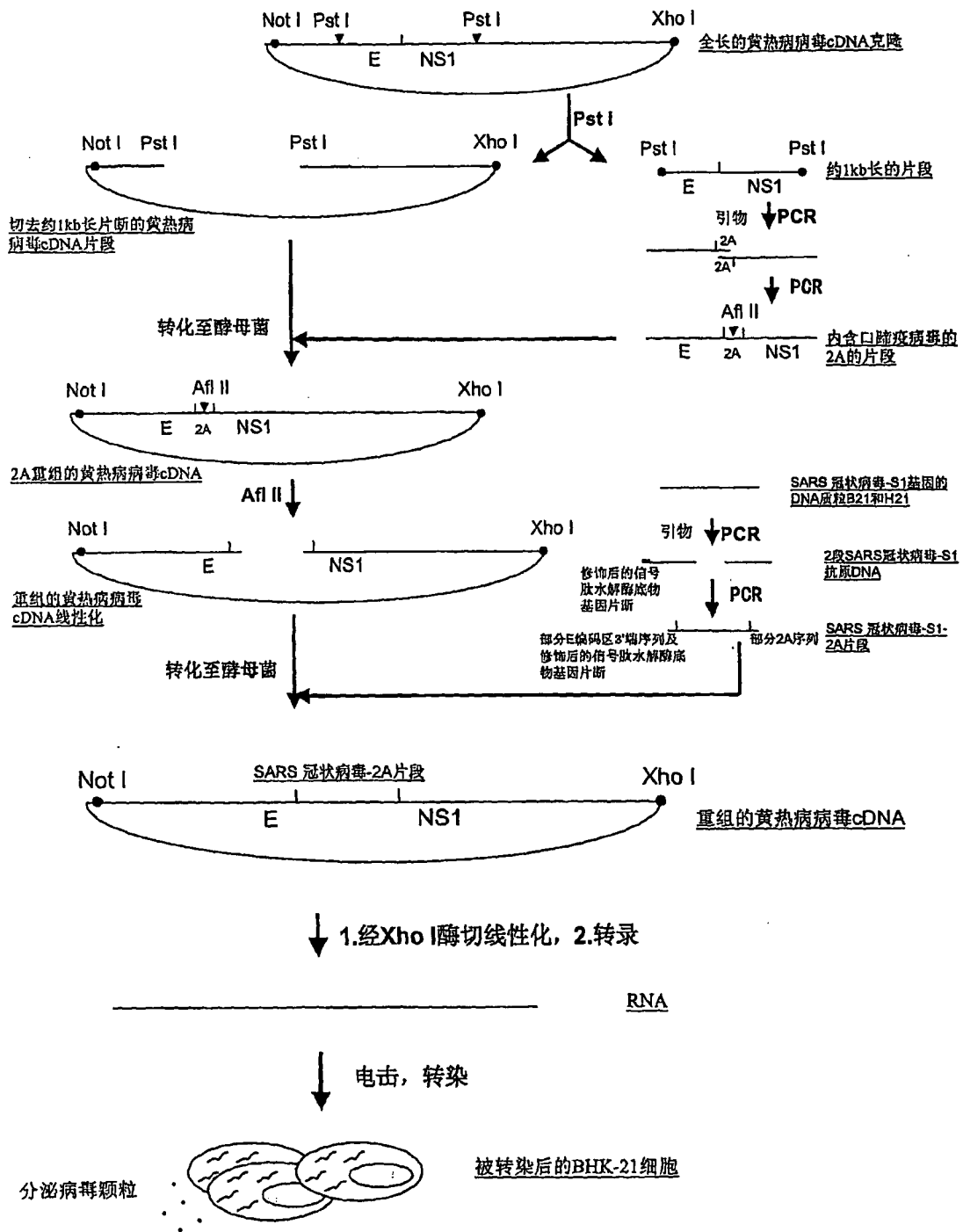


图 6

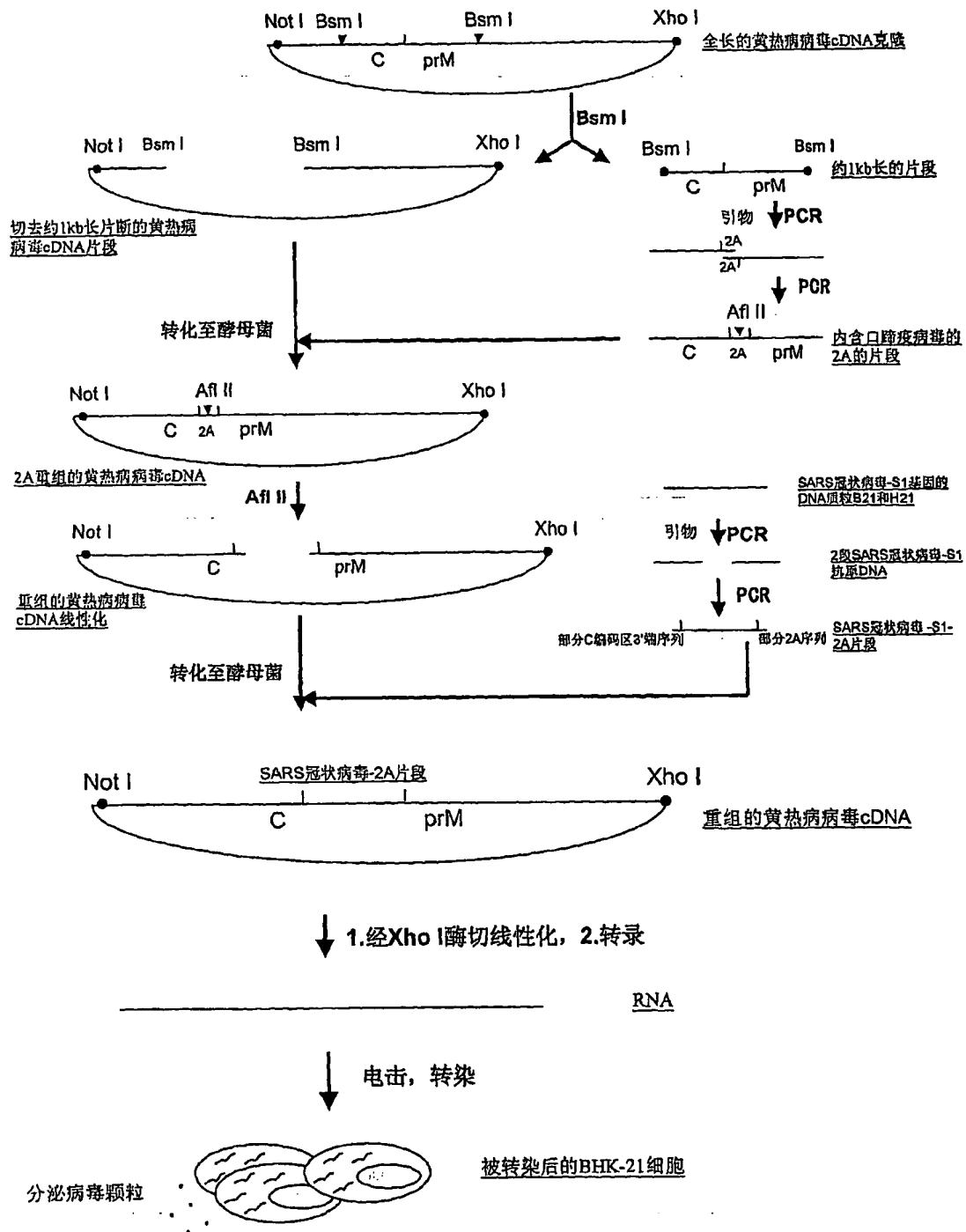


图 7

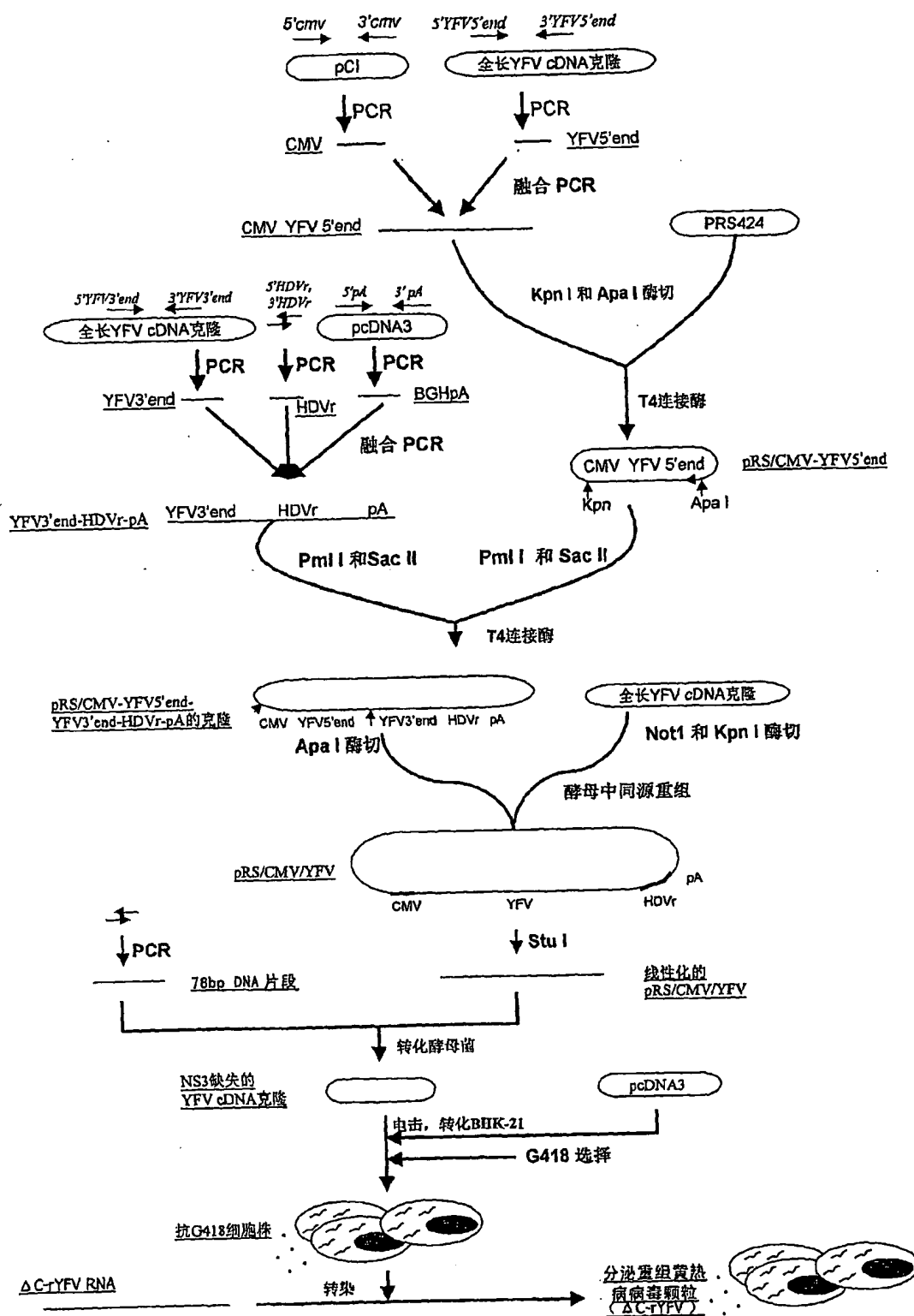


图 8

序列表

<110> 上海天甲生物医药有限公司
美国天甲生物医药有限公司
北京东方天甲科技发展有限公司

<120> 重组的以黄热病毒为载体的疫苗

<130> 034975

<150> CN 03141721.3

<151> 2003-07-21

<160> 43

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> 口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus)

<400> 1

cagctgttga attttgacct tcttaagctt gcgggagacg tcgagtccaa ccctggcccc 60

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> 信号肽水解酶底物

<400> 2

Pro Gln Ala Gln Ala

1 5

<210> 3

<211> 1920

<212> DNA

<213> SARS 冠状病毒(SARS coronavirus)

<400> 3

```

atgtttattt tcttattatt tcttactctc actagtggta gtgacctga ccggtgcacc 60
acttttgatg atgttcaagc tcctaattac actcaacata ctctatctat gagggggggt 120
tactatcctg atgaaatatt tagatcagac actctttatt taactcagga tttatttctt 180
ccattttatt ctaatgttac aggggttcat actattaatc atacgtttgg caaccctgtc 240
atacctttta aggatgggtat ttattttgct gccacagaga aatcaaatgt tgtccgtggt 300
tgggtttttg gtctaccat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat taacaattct 360
actaatgttg ttatcagagc atgtaacttt gaattgtgtg acaacccttt ctttgctgtt 420
tctaaaccca tgggtacaca gacacatact atgatattcg ataatgcatt taattgcact 480
ttcgagtaca tatctgatgc cttttcgctt gatgtttcag aaaagtcagg taattttaaa 540
cacttacgag agtttgtgtt taaaaataaa gatgggtttc tctatgttta taagggtcat 600
caacctatag atgtagttcg tgatctacct tctggtttta acactttgaa acctattttt 660
aagttgcctc ttggtattaa cattacaaat ttagagcca ttcttacagc cttttcacct 720
gtcacaagaca ttgggggcac gtcagctgca gcctattttg ttggctattt aaagccaact 780
acatttatgc tcaagtatga tgaaaatggt acaatcacag atgctgttga ttgttctcaa 840
aatccacttg ctgaactcaa atgctctgtt aagagctttg agattgacaa aggaatttac 900
cagacctcta atttcagggt tgttccctca ggagatgttg tgagattccc taatattaca 960
aacttgtgtc cttttggaga ggtttttaat gctactaaat tcccttctgt ctatgcatgg 1020
gagagaaaaa aaatttctaa ttgtgttgct gattactctg tgctctacaa ctcaacattt 1080
ttttcaacct ttaagtgtca tggcgtttct gccactaagt tgaatgatct ttgcttctcc 1140
aatgtctatg cagattcttt tgtagtcaag ggagatgatg taagacaaat agcgccagga 1200
caaaactggg ttattgtctg ttataattat aaattgccag atgatttcat gggttgtgtc 1260
cttgcttggg atactaggaa cattgatgct acttcaactg gtaattataa ttataaatat 1320

```

aggtatctta gacatggcaa gcttaggccc tttagagag acatatctaa tgtgcctttc 1380
 tcccctgatg gcaaaccttg caccacacct gctcttaatt gttattggcc attaatgat 1440
 tatggttttt acaccactac tggcattggc taccaacctt acagagttgt agtactttct 1500
 tttagaacttt taaatgcacc ggccacggtt tgtggacca aattatccac tgaccttatt 1560
 aagaaccagt gtgtcaattt taattttaat ggactcactg gtactgggtg gttactcct 1620
 tcttcaaaga gatttcaacc atttcaacaa ttggccgtg atgtttctga tttcactgat 1680
 tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata ttagacattt caccctgcgc ttttgggggt 1740
 gtaagtgtaa ttacacctgg aacaaatgct tcatctgaag ttgctgttct atatcaagat 1800
 gtttaactgca ctgatgtttc tacagcaatt catgcagatc aactcacacc agcttggcgc 1860
 atatattcta ctggaaacaa tgtattccag actcaagcag gctgtcttat aggagctgag 1920

<210> 4
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(51)
 <223> 引物

<400> 4
 gcggcgcc gcatttaggt gacactatag agtaaatcct gtgtgcta t 51

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> 引物

<400> 5
 caccgtatga attcctttcc c 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> 引物

<400> 6
 ggagacaccg cctgggattt c 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> 引物

<400> 7
 cacgtagtac atttcatgag t 21

<210> 8
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> 引物

 <400> 8
 ccatacatgc cagatgttct tgagaaactg gaattgctcc aa 42

 <210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)
 <223> 引物

 <400> 9
 cccctcgagt ggttttgtgt ttgtcatcca 30

 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> 引物

 <400> 10
 ggatacaagg ttcagacgaa c 21

 <210> 11
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(97)
 <223> 引物

 <400> 11
 aaccatcgat tcggggccag ggttgactc gtctcccgca agcttaagaa ggtcaaaatt 60
 caacagctgc atatgccaca agacatcccc acttctc 97

 <210> 12
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(81)
 <223> 引物

 <400> 12
 aaccctggcc ccgaatcgat ggttcgaggc gcgcgacgca gcggtgacgt actctgggat 60
 attccacac ctaagatcat c 81

 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> 引物

<400> 13
 cgctgcccaa cctctagcgg c

21

<210> 14
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(84)
 <223> 引物

<400> 14
 cagctgttga attttgacct tcttaagctg gccggcgatg tggaatcaaa tcccgggcct
 atgtttattt tcttattatt tctt

60

84

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> 引物

<400> 15
 ggtgggggtgc aaggtttgcc atca

24

<210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> 引物

<400> 16
 cctttgagag agacatatct aatg

24

<210> 17
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(81)
 <223> 引物

<400> 17
 ggggccaggg ttggactcga cgtctccgc aagcttaagc agatcgaagt tcaggagtgtg
 ctcagctcct ataagacagc c

60

81

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> 引物

<400> 18

gtcaagaacc caactgacac t

21

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> 引物

<400> 19

aaggtcaaaa ttcaacagct gaaagaagat ggcgcatcct tg

42

<210> 20

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(81)

<223> 引物

<400> 20

cagctgttga attttgacct tcttaagctt gcgggagacg tcgagtccaa ccctggcccc
aacatgacaa tgtccatgag c

60

81

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> 引物

<400> 21

ccagacccgg ttgaaaacg g

21

<210> 22

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(78)

<223> 引物

<400> 22

agcatgatct tggtaggagt gatcatgatg tttttgtctc cacaagccca agccagtgc
cttgaccggt gcaccact

60

78

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> 引物

<400> 23

gccagtttga tgagaggatt g

21

<210> 24

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(75)

<223> 引物

<400> 24

agggttggac tgcagctctc ccgcaagctt aagaaggtca aaattcaaca gctgcactcc
acccgtcatc aacag

60

75

<210> 25

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(48)

<223> 引物

<400> 25

ggagacgtcg agtccaaccc tggccctcc catgatgttc tgactgtg

48

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> 引物

<400> 26

ctctctccac accccgccac t

21

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(38)

<223> 引物

<400> 27

aaatatgctg ccgcttgaca ttgattattg actagtta

38

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> 引物

<400> 28
aattagcaca caggatttac tcggttcact aaacgagctc tg 42

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 引物

<400> 29
agtaaactcct gtgtgctaata t 21

<210> 30
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> 引物

<400> 30
taccaccacg tgggctgtga tcttttttcc 30

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)
<223> 引物

<400> 31
atcacagccc acgtggtggt agaaagacgg 30

<210> 32
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(42)
<223> 引物

<400> 32
gtggagatgc catgccgacc cagtggtttt gtgtttgtca tc 42

<210> 33
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(48)
<223> 引物

<400> 33
gggtcggcat ggcatctcca cctcctcgcg gtccgacctg ggcatccg 48

<210> 34
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(55)
 <223> 引物

<400> 34
 ctcccttagc catccgagtg gacgtgcgtc ctccttcgga tgcccaggtc ggacc 55

<210> 35
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> 引物

<400> 35
 ccactcggat ggctaaggga gctagagctc gctgatcagc ct 42

<210> 36
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)
 <223> 引物

<400> 36
 tatatccgcg gagaatagaa tgacacctac tc 32

<210> 37
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(60)
 <223> 引物

<400> 37
 gtgaaggaag aaggaaagga ggagctccaa gagatcccg ctaggaaca tgagatcttg 60

<210> 38
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(39)
 <223> 引物

<400> 38
 tgtttcaccg ctgtcattca agatctcatg ttcctcagg 39

<210> 39
 <211> 78
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(78)

<223> 寡核苷酸

<400> 39

gtgaaggaaag aaggaaagga ggagctccaa gagatcccgc ctgaggaaca tgagatcttg 60
aatgacagcg gtgaaaca 78

<210> 40

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(84)

<223> 引物

<400> 40

cagctgttga attttgacct tcttaagctg gccggcgatg tggaaatcaaa tcccgggcct 60
atggagaaca tcacatcagg attc 84

<210> 41

<211> 84

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(84)

<223> 引物

<400> 41

ggggccaggg ttggactcga cgtctccgc aagcttaagc agatcgaagt tcaggagttg 60
aatgtatacc caaagacaaa agaa 84

<210> 42

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(78)

<223> 引物

<400> 42

agcatgatct tggtaggagt gatcatgatg ttttgtctc cacaagccca agccatggag 60
aacatcacat caggattc 78

<210> 43

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(63)

<223> 引物

<400> 43

ttcctaattt tgggaatgct gttgatgacg ggtggagtga tggagaacat cacatcagga 60
ttc 63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C12N 15/86 C12N15/50 C12N 15/51 A61K39/00 C12N 7/01

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC PAJ CA(YFV YELLOW FEVER VIRUS FLAVIVIRUS VACCIN+ HYDROLASE PROTE+ ETAL)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN,A,1398297, 19.Feb.2003(19.02.2003) see page 2 line10-page 3 line 23, page 9 line 12-page 14 line 24, examples	1、2、4-6、8、9
Y	CN,A,1398297, 19.Feb.2003(19.02.2003) see page 2 line10-page 3 line 23, page 9 line 12-page 14 line 24, examples	7、10
Y	WO,A1,02066621, 29.Aug.2002(29.08.2002) see page 4 para 4-page 11 para 3,examples	7、10
A	CN,A,1253506, 17.May 2000(17.05.2000), see the whole document	1-10
A	GB,A,2372991, 11.Sep.2002(11.09.2002), see the whole document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20.Oct.2004

Date of mailing of the international search report
04 . NOV 2004 (0 4 . 1 1 . 2 0 0 4)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd. Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, P.R.China

Authorized officer

DING Huiping
印 志

Telephone No. (86-10)62085300

Facsimile No. (86-10)62019451

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000845

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Guirakhoo, F ET AL: "Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine." , Journal of Virology, Vol. 75, no. 16, 2001, pages 7290-7304	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2004/000845

Patent document Cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN1398297A	19-02-2003	US2003157128 A1	21-08-2003
		WO0153467 A1	26-07-2001
		AU200129656 A	31-07-2001
		BR200107703	15-10-2002
		EP1250421 A1	23-10-2002
		JP2003520597T	08-07-2003
		US6589531 B1	08-07-2003
WO02066621A	29-08-2002	AT410634B B	15-05-2003
		AT200100272 A	15-11-2002
CN1253506A	17-05-2000	AU740961 B	15-11-2001
		WO9837911 A1	03-09-1998
		AU6443198 A	18-09-1998
		NO9904185 A	27-10-1999
		CZ9903064 A3	12-01-2000
		EP0977587 A1	09-02-2000
		BR9807873 A	21-03-2000
		HU200002139 A2	30-10-2000
		KR2000075830 A	26-12-2000
		MX9907949 A1	01-08-2000
		JP2001514622T T	11-09-2001
		WO02072835 A1	19-09-2002
GB2372991A	11-09-2002		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000845

A. 主题的分类

IPC7: C12N 15/86 C12N15/50 C12N 15/51 A61K39/00 C12N 7/01

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CNKI

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT WPI EPODOC PAJ CA(黄热病 黄热病毒 黄病毒 疫苗 水解酶 蛋白酶等 YFV YELLOW FEVER VIRUS FLAVIVIRUS VACCIN+ HYDROLASE PROTE+ ETAL)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN,A,1398297(加利福尼亚大学董事会)2003 年 2 月 19 日 (19.02.2003), 说明书第 2 页第 10 行—第 3 页 23 行, 第 9 页第 12 行—第 14 页第 24 行, 实施例	1、2、4-6、8、9
Y	CN,A,1398297(加利福尼亚大学董事会)2003 年 2 月 19 日 (19.02.2003), 说明书第 2 页第 10 行—第 3 页 2-23 行, 第 9 页第 12 行—第 14 页第 24 行, 实施例	7、10
Y	WO,A1,02066621(弗朗兹·X·海因茨), 2002 年 8 月 29 日 (29.08.2002), 说明书第 4 页第 4 段—第 11 页第 3 段, 实施例	7、10
A	CN,A,1253506(奥拉瓦克斯公司), 2000 年 5 月 17 日 (17.05.2000), 全文	1-10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

20.10 月 2004

国际检索报告邮寄日期

04.11月 2004 (04.11.2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

电话号码: (86-10)62085300



国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/000845

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	GB,A,2372991(FIOCRUZ FUNDACAO OSWALDO CRUZ (BR)),2002 年 9 月 11 日 (11.09.2002), 全文	1-10
A	Journal of Virology, 第 75 卷, 第 16 期, 2001 年出版, Guirakhoo, F ET AL: “在非人灵长目中嵌合黄热登革病毒三价疫苗的构建、安全性和免疫性”, 第 7290-7304 页。	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/000845

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1398297A	19-02-2003	US2003157128 A1	21-08-2003
		WO0153467 A1	26-07-2001
		AU200129656 A	31-07-2001
		BR200107703	15-10-2002
		EP1250421 A1	23-10-2002
		JP2003520597T	08-07-2003
		US6589531 B1	08-07-2003
WO02066621A	29-08-2002	AT410634B B	15-05-2003
		AT200100272 A	15-11-2002
CN1253506A	17-05-2000	AU740961 B	15-11-2001
		WO9837911 A1	03-09-1998
		AU6443198 A	18-09-1998
		NO9904185 A	27-10-1999
		CZ9903064 A3	12-01-2000
		EP0977587 A1	09-02-2000
		BR9807873 A	21-03-2000
		HU200002139 A2	30-10-2000
		KR2000075830 A	26-12-2000
		MX9907949 A1	01-08-2000
		JP2001514622T T	11-09-2001
GB2372991A	11-09-2002	WO02072835 A1	19-09-2002